รายการอ้างอิง

จินตนา ศิรินาวิน.2536. พันธุศาสตร์ก้าวหน้า . เอกสารประกอบการอบรมระยะสั้น. กรุงเทพมหานคร : คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

ธันยชัย สุระ. 2534. ความรู้พื้นฐานเรื่องเวชพันธุศาสตร์. วารสารโลหิตวิทยา และเวชศาสตร์บริการโลหิต. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4 : 464-467.

มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, สุณี เกิดบัณฑิต และ อำนาจ ชะนะมา, บรรณาธิการ. 2536. เทคนิค PCR ในการวินิจฉัยโรคและแยกวิเคราะห์ยีน. การประชุมเชิงปฏิบัติการ, พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึกในพระบรมราชูปถัมภ์.

สุจิตรา จางตระกูล.2536. หลักการและเทคนิคพื้นฐานในการศึกษา Isoenzyme analysis เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ไม้ป่า . กรุงเทพมหานคร : กลุ่มวนวัฒนวิจัย สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. (อัดสำเนา)

Anderson, W.F. (1992). Human gene therapy. Science . 256 : 808-813.

Becker, P.E. (1962). Two new families of benign sex-linked recessive muscular dystrophy. Rev. Can. Biol . 21 : 551-556.

_____. (1964). Myopathin. In : Becker, P.E. (ed) Humangenetik. Ein kurzes Handbuch, vol 3 . Georg Thieme : Stuttgart.

Beggs, A.H., Koenig, M., Boyce, F.M. and Kunkek, L.M. (1990). Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Human Genet. 86 : 45-48.

Burghes, A.H.M., Logan, C., Hu, X., Belffal, B., Worton, R., and Ray, P.N. (1987). Isolation of a cDNA clone from the region of an X:21 translocation that breaks within the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene. Nature. 328 : 434-436.

Carducci,C., Ellul,L., Antonozzi,I. and Pontecorvi,A. (1992). DNA Elution and Amplification by polymerase chain reaction from dried blood spots. Biotechniques. 13 No 5 : 735-737.

Chamberlain,J.S., Gibbs,R.A., Ranier,J.E. and Caskey,C.T. (1990). PCR protocols : a guide to method and application. New York, London : Acadamic Press.

Eisenstein,B.I. (1990). The polymerase chain reaction : A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. New Eng J Med. 323 : 178-183.

Emery, A.E.H., Dreifuss, F.E. (1966). Unusual type of benign X- linked muscular dystrophy. J. Neural. Neurosurg. Psychiat. 29 : 338-342.

Erlich, H.A., Gelfand, D.H., Saiki, R.K. (1988). Specific DNA amplification. Nature. 311 : 461-462.

_____, ed. (1989). PCR Technology. Stockton Press.

Forrest, S.M., Cross, G.S., Flint, T., Speer, A., Robson, K.J.H., Davies, K.E. (1988). Fuether studies of gene deletions that cause Duchenne and Becker muscular dyatrophies. Genomics . 2 : 109-114.

Francke, U., Ochs, H.D., de Martin Ville, B. (1985). Minor Xp21 chromosome deletion in male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. Am J Hum Genet. 1250-1267.

Harvey, B., Sarnat, M.D., Frep (CAN). (1983). Muscle pathology and Histochemistry . Chicago : Amercan Society of Clinical Pathologists Press.

Hoffman, E.P. and Kunkel, L.M. (1989). Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. Neuron . 2 :1019-1029.

Hopkins, L.C., Jackson, J.A., Elsas, L.J. (1981). Emery - Dreifuss humeroperoneal muscular dystrophy : an X-linked myopathy with unusual contractures and bradycardia. Ann. Neural . 10 : 230-237.

Hu, X., Burghes, A.H.M., Ray, P.N., Thompson, M.W., Murphy, E.G., Worton, R.G. (1988). Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophy. J.Med Genet . 25 : 369-376.

Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD)

cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affectd individuals. Cell . 50: 509-517.

_____., Monaco, A.P. and Kunkel, L.M. (1988). The complete sequence of dystrophin Predicts a Rod-Shaped Cytoskeletal Protein, Cell . 53 : 219-228.

Leyden, E. (1876). Klinik der Ruckenmarkskrankheiten . Berlin : Hirschwald.

Lunis, A.H., Gelfand, G.M., Sninsky, J.J. and White, T.H., eds. (1990). PCR Protocal : a Guide to Methods and Applications : Acadamic Press,Inc.

Malhotra, S.B., Hart, K.A., Klamut, H.J., Thomas, N.S.T., Bodrug, S.E., Burghes, A.H.M., Bobrow, M., Harper, P.S., Thompson, M.W., Ray, P.N., Worton, R.G. (1988). Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. Science . 242 : 755-759.

McKusick, V.A., Francomano, C.A., Antonarakis, E. (1992). Mendelian inheritance in man catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X - linked phenotypes . 10 th ed. Baltimore and London : The Johns Hopkins University press.

Miller, A.D. (1992). Human gene therapy comes to age. Nature. 357 : 455-460.

Mobius, P.S. (1879). Uber die hereditaren Nervenkrankeiten : Volksmanns Samml klin Notiz.

Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., Kunkel, L.M. (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. Genomics . 2 : 90-95.

Moser, H. (1984). Duchenne muscular dystrophy : pathogenic aspects and genetic prevention. Human Genet . 66 : 17-40.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro : the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol . 51 : 263-273.

_____. and Faloona, F.A. (1987). Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase - catalyzed chain reaction. Method Enzymol . 155 : 335-350.

_____. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci.Am. 262 : 36-43.

Nelson V.P., William F.C. and Phillip C.M. (1990). Gene Amplification directly from Guthrie blood spots. The Lancet . 336 : 1451-52.

Rowland, L.P., Fetell, M., Olarte, M., Hays, A., Singh, N., Wanat, F.E. (1979). Emery - Dreifuss muscular dystrophy. Ann Neurol. 5 : 111-117.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlic, H., Arnheim, N. (1985). Novel method for the prenatal diagnosis of sickle cell anemia. Am.J.Hum.Genet. 37 (4 Suppl): 172 .

_____., Scharf, S., Faloona, F. (1985). Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science . 230 : 14-16.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequence among DNA fragment by gel electrophoresis. J. Med. Biol. 98 : 503-517.

Thomas, P.K., Calne, D.B., Elliott, C.F. (1972). X-linked scapuloperoneal syndrome. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat . 35 : 208-215.

Verellen-Dumoulin, C., Freund, M., de Meyer, R., Laterre, C., Frederic, J., Thomson, M.W., Markovic, V.D., and Worton, R.G. (1984). Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non-random X-inactivation. Human Genet. 67 : 115-119.

Voet, D. and Voet, J.G. (1990). Biochemistry . New York : John Wiley & Son Inc.

Winchester, A.M. and Mertens, T.R. (1983). Human Genetics. Sydney. London : Charles E. Merrill Publishing Company.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

การเตรียมอุปกรณ์

หลอดใส่สารเคมี มีฝาปิด เครื่องแก้ว ทิปปิเปต อุปกรณ์ทุกอย่างที่ใช้ใน การทดลอง ต้องทำให้ปลอดนิวคลีเอส ด้วยการออโตเคลป ที่อุณหภูมิ 121^{0}C 15 ปอนด์ 15 นาที

การเตรียมสารเคมี

1) การเตรียมสารเคมีในการสกัด ดีเอ็นเอ จากเลือด

สารเคมี :-

1.1 Anticoagulant : 0.2 M EDTA

1.2 Lysis Buffer : 100 mM Tris-HCl
0.32 M Sucrose
0.01% Triton X-100, pH 7.5

1.3 STE buffer : 50 mM Tris-HCl,pH 7.5
100 mM NaCl
1 mM EDTA, pH 7.5

1.4 10% SDS

1.5 TE buffer : 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
1 mM EDTA

1.6 Proteinase K (GIBCO BRL)

1.7 2 M Sodium acetate, pH 6.0

1.8 Phenol Solution

1.9 Chloroform

1.10 70%, 100% Ethanol

วิธีเตรียมสารเคมี :

1.1 0.2 M EDTA

ละลาย disodium ethylene diamine tetraacetate · 2 H_2O (EDTA) จำนวน 7.44 กรัม ในน้ำ 80 มิลลิลิตร คนให้ละลายมากที่สุดโดยใช้เครื่องกวนสาร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ

1.2 Lysis buffer (100 mM Tris-HCl, 0.32 M Sucrose, 0.01% Triton X-100 pH 7.5)

ผสมสารเหล่านี้เข้าด้วยกันในหลอดแก้วไร้เชื้อ ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย conc. HCl ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อ

Tris-base	12.1	กรัม
sucrose	109.5	กรัม
Triton X-100	10.0	มิลลิลิตร

1.3 STE buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.5)

10X STE : ละลายสารต่อไปนี้เข้าด้วยกันในน้ำ 80 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.5 ด้วย conc. HCl แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการ

ออโตเคลบ (ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:9)

Tris-base	6.05	กรัม
NaCl	5.84	กรัม
EDTA	0.37	กรัม

1.4 10% SDS

ละลาย sodium dodecyl sulfate (sodium lauryl sulfate) จำนวน 10 กรัม ในน้ำ 80 มิลลิลิตร อุ่นที่ 68 ^{0} C จนละลายหมด ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วย conc.HCl ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

1.5 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA)

10X TE : ละลาย Tris-base จำนวน 1.21 กรัม และ EDTA 0.372 กรัม ลงในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย conc.HCl ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ (ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:9)

1.6 Proteinase K (20 mg/ml ในน้ำกลั่น)

ละลาย Proteinase K จำนวน 20 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วไร้เชื้อ แบ่งใส่หลอดไร้เชื้อไว้หลอดละ 500 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ตู้เย็น -20 ^{0} C

1.7 2 M sodium acetate pH 6.0

ละลาย sodium acetate . 3 H_2O จำนวน 27.212 กรัม ในน้ำ 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.0 ด้วย glacial acetic acid ปรับปริมาตร

ให้เป็น 100 มิลลิลิตร ทำให้ไร้เชื้อโดยการออโตเคลบ

1.8 Phenol solution : ฟีนอลที่ใช้จะอิ่มตัวด้วย TE buffer (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)

หลอม Crytalline analytical reagent grade phenol ที่ 50-60 $^{\circ}$C เติม TE buffer ลงไป 1:1 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แล้วดูดชั้นบนทิ้ง จากนั้นเติม 1M Tris-HCl pH 8.0 ลงไปอีก 1:1 แล้วเขย่า ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เมื่อได้สารละลายที่อิ่มตัวแล้วดูดชั้นบนทิ้งโดยให้เหลือชั้น buffer ไว้ประมาณ 1 ซม. (วัด pH ในชั้น buffer ควรจะได้มากกว่า 7.6) เก็บน้ำยาฟีนอลนี้ไว้ในตู้เย็น 4 ^{0} C ในขวดสีชา

** ฟีนอล เป็นสารพิษ ควรสวมถุงมือขณะทำการทดลองและทำใน hood สารละลายฟีนอล ควรมีสีขาว ถ้ามีสีชมพู หรือน้ำตาล ให้ทิ้งไป แล้วใช้ฟีนอลจากขวดใหม่ **

1.9 Chloroform

ผสม chloroform กับ Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 480 มิลลิลิตร : 20 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

1.10 70% Ethanol

เตรียมจาก 90% Ethanol โดยใช้ 90% Ethanol ปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมน้ำจนครบ 90 มิลลิลิตร

2) การเตรียมสารเคมีในการทำพอลิอะคริลลาไมด์เจลอิเลกโตรโฟรีซีส

สารเคมี :

2.1 Polyacrylamide : 30 % Acrylamide, bis acrylamide

2.2 Tris - borate EDTA buffer : 0.89 M Tris, 0.89 M boric acid, 0.025 M EDTA pH 8.3)

2.3 3% Ammonium persulfate

2.4 Tracking dye : 0.025% bromphenol blue, 0.025% Cylene Cyanol, 40% Sucrose

2.5 DNA staining solution : ethidium bromide 2.5 µg/ml

2.6 DNA marker : ϕ X 174/Hae III DNA

วิธีเตรียมสารเคมี :

2.1 Polyacrylamide : 30% acrylamide

ละลาย Acrylamide จำนวน 29 กรัม และ bis acrylamide จำนวน 1 กรัม ในน้ำ 80 มิลลิลิตร คนให้ละลายมากที่สุด โดยใช้เครื่องกวนสาร เมื่อ ละลายเป็นเนื้อเดียวแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เตรียมเป็น stock ที่เข้มข้น 30% เก็บไว้ที่ 4^0 C

2.2 Tris-borate EDTA (TBE) buffer : 0.89 M Tris, 0.89 M boric acid, 0.025 M EDTA pH 8.3

เตรียม 10X TBE โดยละลาย Tris base 108 กรัม boric acid 55 กรัม และ Na_2 EDTA 9.3 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น

1000 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 10X TBE นี้ให้เป็น 1X TBE โดยเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ลงใน 10X TBE จำนวน 100 มิลลิลิตร

2.3 3% Ammonium persulfate

ละลาย Ammonium persulfate จำนวน 3 กรัม ในน้ำ 80 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.4 Tracking dye : 0.025% Bromophenol blue, 0.025 % Xylene Cyanol, 40% Sucrose

ละลาย Bromophenol blue จำนวน 0.025 กรัม Xylene Cyanol จำนวน 0.025 กรัม และ Sucrose 40 กรัม ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร หลังจากละลายหมด ปรับปริมาตร ให้เป็น 100 มิลลิลิตร ไม่ออโตเคลบ (ภาชนะที่ใช้ในการเตรียม และเก็บสีติดตาม ควรผ่านการทำลายนิวคลีเอส โดยการออโตเคลบ)

2.5 DNA staining solution : ethidium bromide 2.5 µg/ml

ละลาย ethidium bromide 2.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บไว้ ในขวดสีน้ำตาล ข้อควรระวัง *ethidium bromide เป็น มิวทาเจน (mutagen) ดังนั้นควรสวมถุงมือ ขณะทำการทดลอง

2.6 DNA marker : ϕ X 174/Hae III DNA (1000 µg/ml), (6X) Blue/Orange loading buffer (Promega)

ละลาย DNA marker ลงใน (1X) Blue/Orange loading buffer ให้มีความเข้มข้น 5 ng/µl และใช้งานในปริมาณ 250 ng

3) การเตรียมสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยพีซีอาร์

สารเคมี :

3.1 10X buffer (Perkin Elmer)

3.2 dNTP (dATP, dCTP , dGTP , dTTP) (Perkin Elmer)

3.3 primer (GSD , Canada)

3.4 Taq DNA Polymerase (Perkin Elmer)

3.5 Oil emulsion (Perkin Elmer)

3.6 Genomic DNA

** ข้อ 3.1-3.5 มีขายสำเร็จรูป ส่วนข้อ 3.6 เตรียมจากเลือดผู้ป่วย

ประวัติผู้ทำวิทยานิพนธ์

นางสาวรุจินี ปติฐพร เกิดวันที่ 5 มกราคม 2512 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา เอกสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปี พ.ศ. 2534

ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2534 ได้รับทุนผู้ช่วยสอนจาก ฝ่ายวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2535 และทุนช่วยวิจัย จากบัณฑิตวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2536